

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication : 2 791 347
 (à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)
 (21) N° d'enregistrement national : 00 00979
 (51) Int Cl⁷ : C 07 K 14/415, C 12 N 15/29, 5/04, 5/10

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) Date de dépôt : 26.01.00.
 (30) Priorité : 24.03.99 JP 07961299.

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 29.09.00 Bulletin 00/39.
 (56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.
 (60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : NAGOYA UNIVERSITY — JP.

(72) Inventeur(s) : SAKAGAMI YOJI, YANG HEPING, MATSUBAYASHI YOSHIKATSU et NAKAMURA KENZO.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

(54) POLYPEPTIDE PRECURSEUR DE PHYTOSULFOKINE, GENE LE CODANT, CELLULE VÉGÉTALE CONTENANT CE GENE ET PROCÉDÉ POUR STIMULER LA PROLIFÉRATION DES CELLULES VÉGÉTALES.

(57) L'invention concerne un polypeptide précurseur de l'agent stimulant la prolifération des cellules végétales phytosulfokine (PSK) qui consiste (a) en un polypeptide ayant la séquence des acides aminés 1 à 89 dans la séquence n° 1 de la liste de séquences ou (b) en un polypeptide ayant une séquence d'acides aminés qui a plus de 40% d'homologie avec la séquence dudit polypeptide (a), un gène codant ce précurseur, une cellule végétale contenant ce gène et un procédé pour stimuler la prolifération d'une cellule végétale par incorporation dudit gène dans cette cellule.

GAACAGACACCAAAAGAACTTGACTGTTATTACAGATCTTCCTCTTTTT 60
 GTGAGAGACAGACAGACAGACAGACAGATCTTCAGATCTTCAGACAGAA 120
 NYFPFAT 7
 GAGCTAGGGCACTCTCCCTCATGCCCTCTCTCTCTCTGTAGGTGAGACACATT 180
 ARALCCLSLALLQEKHSHBGCVGCTTT 27
 GCAAGACCTCTCTTCAGGAGACACACACCCATGCCCTGCCACGGCACACCCA 240
 RELLLQEKHSHBGCVGCTTT 47
 CCAGGAGCTACAGACAGACAGACAGACAGCTGCTGATAGACATAGGCGACCTCG 300
 QEPSPFENGCSTGSHHNGQ 87
 AGTTGCTTACACCAATTCGAGACATTCGACACGTTTATATACACACACATCA 360
 F 5 A X 4 ② F RT ① T T T ③ Q E 87
 AAACCCATATGGCTGTCTATTTATTTTCAGCTAGTACTAGTACTTATACCTCTG 420
 N P 89
 CGGCTTCTGCTTGGAGAGGGATTCTTGATTTACCATATAGACTATTTA 480
 ATTAATGCTACGGCAATACCGCTACGGCTTGGAGAGCTGCTACGCTACTG 540
 TATAATTTAGCTGATACAGACTACCTGCTGACTGCTGCTGCTGCTGCTG 600
 CTGGTTTGGAGAGCTGATATAGCTAGATGCTGACCTCTGAGATGCTG 660
 ATTTTTTACCAAAAAGAGAGAGAGAGAGAGCTTGGCTTGT-T-P1-(A) 725

— SEQUENCE DE GA REPETES
 — SEQUENCE SIGNAL N-TERMINALE
 — SEQUENCE DE PSK-K
 ↑ SITE DE RECONNAISSANCE DE LA PROTEASE V8
 ○ ACIDE AMINE ACIDE



Cette invention est en rapport avec une séquence d'acides aminés d'un polypeptide précurseur de phytosulfokine. La phytosulfokine est un peptide dont on sait qu'elle stimule la prolifération des cellules végétales. Cette invention est en rapport aussi avec un gène qui code ce polypeptide précurseur. De plus, cette 5 invention est en rapport avec un procédé pour stimuler la prolifération des cellules végétales par incorporation de ce gène dans une plante.

Ces dernières années, du fait du développement de l'étude des gènes végétaux, on a introduit différents gènes étrangers dans des végétaux. Une telle technique est disponible pour plusieurs espèces végétales et joue un rôle important 10 dans le développement industriel. Par exemple, une telle technique permet la production de nouvelles espèces végétales avec une productivité améliorée de leurs métabolites secondaires.

Pour la production d'une plante transgénique, il est nécessaire de cultiver un petit nombre de cellules transformées, où un certain gène exogène est 15 incorporé, pour régénérer un végétal entier. Cependant, dans le cas d'une cellule végétale où un certain gène exogène est incorporé, la prolifération d'une telle cellule est très lente. Par conséquent, la régénération d'une plantule pour produire une plante transgénique peut être difficile. Une cellule végétale secrète dans le milieu extracellulaire des agents de stimulation inconnus pour stimuler la division 20 cellulaire. Cependant, quand les cellules végétales existent en concentration insuffisante, la prolifération des cellules végétales devient difficile parce que la durée nécessaire pour que le facteur de stimulation parvienne à une concentration suffisante est trop longue, ou parce que la vitesse de dégradation du facteur de stimulation est plus grande que sa vitesse de sécrétion. De plus, la culture 25 cellulaire elle-même est difficile dans beaucoup d'espèces végétales, ou la vitesse de prolifération cellulaire est très lente. Par conséquent, le développement d'une technique permettant de stimuler la prolifération des cellules végétales a été désiré.

Les demandeurs ont isolé et purifié la phytosulfokine (PSK), à titre de 30 facteur peptidique de stimulation des végétaux évoqué ci-dessus (Y. Matsubayashi et Y. Sakagami, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, p. 7623, 1996). La PSK est l'un des facteurs de stimulation des végétaux contenu dans ce que l'on appelle "le milieu conditionné: MC", un milieu utilisé pour la culture cellulaire. On sait que la PSK est sécrétée dans le milieu extra-cellulaire et a une fonction de type autocrine. 35 On sait aussi que les résidus tyrosine de PSK sont sulfatés par une modification post-traductionnelle. L'existence de deux types de PSK, à savoir PSK- α et PSK- β ,

est reconnue et les séquences correspondantes sont décrites au-dessous. PSK- β est un produit de dégradation enzymatique de PSK- α et l'activité de prolifération cellulaire observée dans PSK- β est inférieure au dixième de celle de PSK- α .

- 5 PSK- α : Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln
 PSK- β : Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr

L'existence d'un peptide végétal physiologiquement actif dans lequel les résidus tyrosine sont sulfatés était inconnue jusqu'à la découverte de PSK.

10 Mais chez les animaux on en connaît approximativement 30 types, y compris la cholécystokinine et la gastrine, qui présentent une telle propriété. Ce sont tous des peptides sécrétés dans le milieu extra-cellulaire qui sont biosynthétisés sous forme de leurs précurseurs, sulfatés et soumis à une maturation pendant leur passage dans l'appareil de Golgi. On suppose que l'excision de la séquence de PSK se

15 produit dans la même manière. La présence d'une certaine séquence signal est prédite sur les peptides précurseurs dont les résidus tyrosine sont sulfatés spécifiquement, car les peptides précurseurs sont sécrétés dans la région extra-cellulaire. À propos du peptide PSK, l'existence d'un peptide précurseur est prédite sur la base d'une telle connaissance. Par conséquent, le gène qui code le

20 polypeptide précurseur de PSK du riz a été isolé et la séquence de bases du gène du précurseur a été déterminée. Le gène ainsi obtenu a été incorporé dans des cellules Oc de riz en culture, et l'effet du gène a été examiné. La surexpression du gène qui code le polypeptide précurseur de PSK augmentait la sécrétion de PSK dans le milieu cultivé et favorisait la prolifération des cellules Oc du riz. La lignée

25 cellulaire Oc du riz provient de la variété C5924 du riz (*Oryza sativa L.*). C'est une lignée cellulaire prépondérante du riz à prolifération rapide obtenue de la manière suivante : des grains de riz (*Oriza sativa L.* C5924) sont stérilisés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5% pendant 10 min et lavés trois fois avec de l'eau distillée stérilisée. Puis ils sont amenés à germer dans des conditions

30 aseptiques dans du milieu basal de Murashige et Skoog (MS). Au bout d'une semaine de germination, des explants radiculaires sont excisés des plantules et cultivés sur du milieu MS gélosé (1%) contenant 1 mg/l de 2,4-D et 0,1 mg/l de kinétine. Les cultures de cals obtenues à partir des explants radiculaires sont sous-cultivées tous les mois sur le milieu utilisé pour l'induction des cals. Les cellules

35 ainsi obtenues sont appelées cellules Oc. Ces cellules sont ensuite sous-cultivées à 25°C à l'obscurité à 120 tr/min dans du milieu MS additionné de 1 mg/l de 2,4-D

à intervalles réguliers de 2 semaines. Les cellules Oc prolifèrent rapidement dans les cultures en suspension.

Le polypeptide précurseur de PSK (préprophytosulfokine) de cette invention est identifié par une séquence d'acides aminés appelée séquence n°. 1 dans la liste de séquences annexée et le gène qui code la préprophytosulfokine est identifié par une séquence de bases appelée séquence n°. 2 dans la liste de séquences annexée.

En général, un acide aminé est codé par plusieurs codons d'ADN. Par conséquent, plusieurs gènes, différents du gène natif de cette invention, peuvent coder des séquences d'acides aminés identiques à celle de la préprophytosulfokine. Le gène de cette invention n'est pas limité au gène natif seulement et inclut beaucoup d'autres séquences de bases qui codent la préprophytosulfokine.

Le polypeptide précurseur de PSK de cette invention inclut un polypeptide qui a une séquence d'acides aminés qui a au moins 40% d'homologie avec la séquence d'acides aminés appelée séquence n°. 1 dans la liste de séquences annexée, dans la mesure où il conserve les caractéristiques biochimiques de la préprophytosulfokine. De préférence, le polypeptide précurseur de cette invention a plus de 50% d'homologie avec la séquence d'acides aminés appelée séquence n°. 1 dans la liste de séquences annexée. De préférence encore, le polypeptide précurseur de cette invention a plus que 80% d'homologie avec la séquence d'acides aminés appelée séquence n°. 1 dans la liste de séquences annexée.

De plus, le gène de cette invention inclut un gène qui code le polypeptide précurseur de PSK décrit ci-dessus et qui consiste en une séquence de bases qui s'hybride dans des conditions strictes ou stringentes avec la séquence de bases appelée séquence n°. 2 dans la liste de séquences annexée.

La prolifération d'une cellule végétale peut être stimulée par incorporation d'un gène qui code la préprophytosulfokine bien qu'une cellule végétale où un certain gène exogène est incorporé ait tendance à voir sa vitesse de prolifération diminuer. Par conséquent, la différenciation cellulaire et la régénération d'une plantule peuvent être accomplies par incorporation du gène qui code la préprophytosulfokine. De plus, une amélioration de la croissance d'une plante peut être obtenue par incorporation du gène. Le gène selon cette invention peut être incorporé dans plusieurs plantes. Les plantes décrites dessous sont des plantes préférables pour l'incorporation du gène. Ce sont des plantes monocotylédones comme le riz, le maïs, l'asperge et le blé ou des plantes dicotylédones comme l'arabidopsis, le tabac, la carotte, le soja, la tomate et la

pomme de terre. Les techniques communes connues peuvent être adoptées pour produire un transformant. A titre d'exemple de vecteur disponible, on peut citer pAct-nos/Hmz. Un tel vecteur peut être introduit dans Agrobacterium, par exemple, et un transformant peut être produit par infection d'un cal ou d'une jeune 5 plante.

D'autres objets et avantages de l'invention deviendront plus apparents à la lecture de la description détaillée qui suit et se réfère aux dessins annexés dans lesquels :

La figure 1 montre la séquence de bases du gène *OsPSK* et la séquence 10 d'acides aminés correspondante.

La figure 2 montre la détection d'analogues de PSK qui existent dans un milieu conditionné de cellules Oc de riz transformées, par chromatographie liquide-spectrométrie de masse (CL-SM).

La figure 3 montre des cellules Oc du riz non transformées après deux 15 semaines de culture.

La figure 4 montre des cellules Oc de riz où le gène *OsPSK* est incorporé dans l'orientation sens, après deux semaines de culture.

La figure 5 montre des cellules Oc de riz où le gène *OsPSK* est incorporé dans l'orientation antisens, après deux semaines de culture.

20 La figure 6 représente un transfert de Western montrant la détection du gène *OsPSK* dans des cellules Oc du riz où le gène est incorporé dans l'orientation sens et dans l'orientation antisens.

La figure 7 représente un transfert de Western montrant l'expression du gène *OsPSK* dans des cellules Oc du riz au bout de 3, 7, 10 et 14 jours.

25 La figure 8 représente un transfert de Western montrant l'expression du gène *OsPSK* dans des cellules Oc du riz où le gène est incorporé dans l'orientation sens et dans l'orientation antisens.

La figure 9 représente un transfert de Western montrant l'expression 30 du gène *OsPSK* dans des plants de riz, examinée sur plusieurs parties d'un corps végétal.

La figure 10 représente un transfert de Western montrant le nombre de copies du gène *OsPSK*, examiné après traitement avec diverses enzymes de restriction.

35 La figure 11 représente un transfert de Western montrant la conservation du gène *OsPSK* examinée sur *Arabidopsis thaliana*, *Asparagus officinalis*, *Daucus carota* et *Zinnia elegans*.

Un criblage a été exécuté comme décrit au-dessous, sur une banque d'ADNc construite à partir de cellules Oc du riz avec des sondes constituées par un mélange d'oligonucléotides, pour tenir compte de la dégénérescence du code génétique, qui correspondent à la séquence d'acides aminés de PSK. L'ARN poly (A)+ a été purifié avec une colonne d'oligo (dT) à partir de cellules Oc cultivées pendant 10 jours. Une banque d'ADNc a été construite avec le kit de synthèse d'ADNc ZAP (Stratagene, La Jolla, CA). Quatre-vingt-seize types d'oligonucléotides 15-mères qui correspondent à la séquence d'acides aminés de PSK- α ont été synthétisés, marqués avec [γ - 32 P]ATP avec un kit de kination (Toyobo, Osaka), et utilisés pour cribler la banque d'ADNc par hybridation sur plages à 25°C dans une solution qui contient 6X de citrate de sodium salin (SSC), 20 mM de NaH₂PO₄, 0,4% de SDS, 5X de solution de Denhardt et 500 mg/l d'ADN de sperme de saumon. Les filtres ont été lavés plusieurs fois avec 6X SSC et 0,1% SDS à 25°C pendant une heure. A titre de résultat, trois clones d'ADNc 15 s'hybridaient avec les sondes.

Les plasmides pBluescript qui contiennent les inserts positifs ont été excisés et introduits dans la souche SOLR de Escherichia coli. Les inserts sous-clonés ont été séquencés avec le kit de séquençage Big Dye Terminator Cycle et l'analyseur génétique PRISME ABI 310 (Applied Biosystems, Foster, CA) 20 conformément aux protocoles du fabricant. Le résultat a montré qu'un clone d'ADNc code le précurseur de phytosulfokine. L'ADNc ainsi obtenu est appelé *OsPSK*.

Le résultat de l'analyse de la séquence a révélé que l'ADNc *OsPSK* avait une longueur de 725 paires de bases (pb). La séquence de bases de l'ADNc *OsPSK* est montrée dans la séquence supérieure de Fig. 1 et dans la séquence n°. 2 de la liste de séquences annexée. La séquence contient seize GA répétés dans la région non traduite en 5' (Fig. 1 ligne pointillée). Le cadre de lecture ouvert était long de 267 pb et code la préprophytosulfokine (précurseur du polypeptide PSK) consistant en 89 acides aminés. La séquence d'acides aminés de la préprophytosulfokine est montrée dans la séquence inférieure de la Fig. 1 et dans la séquence n°. 1 de la liste de séquences annexée. La séquence de la Fig. 1 suggère une masse moléculaire prédictive de 9,8 kDa et un point isoélectrique de 6,48. Une région hydrophobe de 22 acides aminés qui ressemblait à un peptide signal clivable a été trouvée à l'extrémité NH₂-terminale de la préprophytosulfokine. Une telle structure de région hydrophobe est trouvée dans des précurseurs de peptides bioactif des animaux. La forme mature prédictive de la

préprophitosulfokine contient un haut pourcentage d'acides aminés chargés (6% d'acide aspartique, 7,5% d'acide glutamique, et 6% de lysine) et est par conséquent hydrophile. Parmi les 89 acides aminés de la préprophitosulfokine, les acides aminés 80 à 84 codent PSK- α (Fig. 1 ligne double).

5 Les tyrosines sulfatées sont habituellement localisées dans les régions acides de protéines sécrétaires. Tous les sites qui ont été caractérisés dans les animaux contiennent des résidus acide aspartique et acide glutamique près de la tyrosine sulfatée. Les acides aminés acides sont montrés par des cercles dans la Fig. 1. Il y a un résidu acide aspartique en position immédiatement NH₂-terminale
 10 -1 par rapport à la première tyrosine de PSK, et deux ou trois résidus acides sont trouvés entre -5 et +5 par rapport au premier ou deuxième résidu tyrosine dans PSK- α , respectivement. Une telle caractéristique de la structure suggère que les résidus tyrosine pourraient être sulfatés par la sulfotransférase. Les sites de maturation supposés qui sont contigus à PSK sont conformes à la séquence
 15 consensus pour la peptidase V8, ce qui suggère que PSK pourrait être obtenue par maturation protéolytique à partir de la préprophitosulfokine. Les sites de reconnaissance par la peptidase V8 sont indiqués par les flèches. Aucune homologie significative n'a été trouvée entre l'ADNc et d'autres séquences dans les banques de données d'ADN, à l'exception de plusieurs marqueurs de séquence
 20 du riz exprimés sans fonction connue.

Pour confirmer que le gène *OsPSK* code effectivement PSK, des cellules Oc du riz ont été transformées avec un ADNc d'*OsPSK* muté. Les ADNc mutés utilisés pour la transformation sont conçus pour produire de la PSK- α ou de la PSK- β mutée où la thréonine, localisée à la quatrième place du peptide, est remplacée par la sérine. La PSK- α obtenue est appelée [Ser⁴]PSK- α et la PSK- β est appelée [Ser⁴]PSK- β . Les séquences de [Ser⁴]PSK- α et [Ser⁴]PSK- β sont présentées ci-dessous.

30 [Ser⁴]PSK- α : Y(SO₃H)IY(SO₃H)SQ
 [Ser⁴]PSK- β : Y(SO₃H)IY(SO₃H)S

Une amorce 22-mère (5'-CATCTTGGGAGTAGATATAATC-3') a été synthétisée et utilisée pour obtenir l'ADNc de préprophitosulfokine muté décrit ci-dessus avec un kit de mutagenèse in vitro (Takara, Tokyo). Le plasmide pAct-nos/Hmz qui contient des gènes de résistance à la kanamycine et à l'hygromycine pour la sélection de transformants a été employé comme vecteur binaire pour la

transformation de cellules Oc. L'ADNc de type sauvage ou muté concernant la sérine a été excisé avec Sma I et Eco RV et inséré dans le site Sma I du vecteur. L'expression des gènes chimères était sous le contrôle du promoteur de l'actine du riz incorporé dans le vecteur binaire. Les constructions ont été utilisées pour
5 transformer la souche d'*Agrobacterium* LBA4404 par appariement triparental (procédé de transfert d'un plasmide binaire de *E. coli* à *Agrobacterium* par co-culture de *E. coli* contenant le plasmide binaire, de *E. coli* auxiliaire contenant un plasmide auxiliaire (pRK2013) et de l'organisme receveur *Agrobacterium*), et la transformation de cellules Oc à médiation par *Agrobacterium* a été exécutée.
10 Les quantités de PSK- α et de ses analogues, libérées dans le milieu par la souche de type sauvage ou le transformant, ont été mesurées par analyse par chromatographie liquide/ spectrométrie de masse (CL/SM). Un milieu conditionné (MC) obtenu à partir de cellules Oc de type sauvage ou transformées cultivées pendant 14 jours a été chromatographié sur une colonne de DEAE Sephadex A-
15 25. Les PSK- α et PSK- β contenues dans les fractions de 800 et 1200 mM de KCl ont été adsorbées sur des cartouches Sep-PakVac, éluées avec de l'acétonitrile à 30% qui contient 0,1% d'acide trifluoroacétique, et lyophilisées. Les spectres de masse ont été obtenus avec un spectromètre de masse VG Platform Quadrupole® Fisons avec ionisation à électropulvérisation (ou électrospray) connecté à un système de CLHP Jasco PU980. Les fractions qui contiennent les PSK ont été dissoutes dans 200 μ l d'eau et séparées sur une colonne de CLHP en phase inverse (4,6 x 250 mm) avec de l'acétonitrile à 10% qui contient 0,1% d'acide trifluoroacétique à 1,0 ml/min. Les ions pseudomoléculaires de PSK ont été surveillés par balayage toutes les 1,9 s en mode de surveillance sélectif à l'égard
20 25 des ions. Les séquences d'acides aminés des peptides ont été déterminées par un séquenceur Applied Biosystems modèle 490.

Le résultat de l'analyse quantitative d'analogues de PSK exécutée par CL-SM comme décrit ci-dessus est montré dans la Fig. 2. Dans la Fig. 2 les pics qui correspondent à [Ser⁴] PSK- α (temps de rétention 6,9 min), PSK- α (temps de rétention 8,0 min), [Ser⁴] PSK- β (temps de rétention 9,0 min) et PSK- β (temps de rétention 12,7 min) ont été détectés dans le liquide d'élution provenant du milieu conditionné des cellules Oc transgéniques contenant l'ADNc muté. En outre, les peptides contenus dans les fractions correspondantes ont été séquencés et il a été confirmé qu'il s'agissait bien de [Ser⁴] PSK- α et de [Ser⁴] PSK- β , ce qui est en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'ADNc *OsPSK* code la préprophytosulfokine et PSK- β est un produit de dégradation enzymatique de PSK- α .
30 35

En outre, l'ADNc *OsPSK* a été introduit dans l'orientation sens et dans l'orientation antisens dans des cellules Oc avec le même vecteur binaire. Puis les quantités de PSK- α et de PSK- β ont été analysées par CL-SM. Les cellules Oc témoins ou transformées (0,8 g) ont été placées dans 100 ml de milieu frais et les 5 quantités de PSK- α et de ses analogues ont été déterminées par analyse au bout d'une semaine de culture.

Les résultats indiqués par la valeur moyenne de trois expériences indépendantes sont montrés dans Tableau 1 avec les écarts-types (unité de concentration nM). La PSK- α et la PSK- β accumulées dans le milieu conditionné 10 du transformant sens étaient 1,6 fois plus concentrées que dans le témoin. L'augmentation de la sécrétion de PSK s'est révélée être due à l'introduction du gène. Les quantités de PSK- α et de PSK- β accumulées dans le milieu conditionné du transformant antisens étaient inférieures à 60% du niveau témoin moyen, ce qui 15 indique une baisse de la sécrétion de PSK. D'autre part, la quantité totale de [Ser⁴]PSK- α et de [Ser⁴]PSK- β était égale à 34% de PSK- α et de PSK- β de type sauvage seulement, ce qui suggère que le remplacement d'acides aminés peut diminuer l'efficacité de la maturation et/ou de la modification.

Tableau 1.

20 Accumulation de PSK dans du milieu conditionné par des cellules Oc témoins ou transgéniques

	type cellulaire	PSK- α	PSK- β	[SER ⁴]PSK- α	[SER ⁴]PSK- β
	témoin	12,6+1,1	332,7+20,1	0	0
25	antisens	7,3+0,4	175,8+15,4	0	0
	sens	21,0+1,9	555,7+31,1	0	0
	mutant [Ser ⁴]	11,5+0,9	302,5+15,8	3,1+0,3	105,2+8,9

30 L'effet du gène *OsPSK* sur la prolifération cellulaire a été étudié. Le résultat a montré que les cellules transgéniques sens S2 se divisaient approximativement deux fois plus vite (Fig. 4) que le témoin (Fig. 3), tandis que les transformants antisens A2 ralentissaient leurs activités mitogènes cellulaires (Fig. 5). De plus, le fait de munir les transformants antisens de PSK- α permettait de rétablir en partie leurs activités mitogènes (38-64%), ce qui indique que le gène 35 *OsPSK* favorise la division des cellules végétales.

Puis la présence du gène incorporé dans les cellules transformées a été confirmée par transfert de Southern (Fig. 6). Dans la Fig. 6, chaque piste indique les échantillons suivants :

- 5 W: eau seulement
N: cellules Oc du riz non transformées
Al-A4: cellules transformées antisens
S1-S4: cellules transformées sens
P: vecteur d'expression seulement

10 Dans la Fig. 6, une bande de 0,5 kb qui correspond au gène *OsPSK* incorporé a été identifiée dans les cellules transformées sens S1-S4 et dans les cellules transformées antisens A2. La bande de 1,6kb qui correspond au gène *OsRac1* endogène (gène de l'actine du riz qui existe de manière endogène dans les cellules Oc et qui est utilisé comme gène témoin du fait de son expression 15 constitutive) a été observée dans les cellules transformées sens et dans les cellules transformées antisens.

20 La modification de l'expression du gène *OsPSK* qui se produit pendant la période de culture a été analysée par analyse par transfert de Northern exécutée par hybridation avec un ADNc de longueur intégrale marqué à 60°C. Dans la Fig. 7, la piste 1, la piste 2, la piste 3 et la piste 4 indiquent les résultats au bout de 3 jours, 7 jours, 10 jours et 14 jours, respectivement. Les résultats dans la Fig. 7 montrent que le gène *OsPSK* a été exprimé de façon continue dans les cellules Oc cultivées en fournissant PSK de manière continue et a permis aux cellules de proliférer rapidement. Surtout, le gène *OsPSK* a été exprimé le plus abondamment 25 au bout de 10 à 14 jours. L'expression du gène *OsPSK* dans les cellules transformées a été confirmée dans la Fig. 8. L'expression du gène *OsPSK* dans les cellules transformées sens de la piste 1 a augmenté par rapport à celle des cellules non transformées (piste 3). D'autre part, l'expression dans les cellules transformées antisens diminuait (voie 2). De plus, la configuration de l'expression 30 a été examinée sur un plant de riz (Fig. 9). La configuration montrée dans les pistes 1, 2, 3, 4, 5 indique les résultats pour la première feuille, la deuxième feuille, l'extrémité de la pousse, la racine latérale et la racine de la graine, respectivement. Une expression significative du gène dans l'extrémité de la pousse et la racine de la graine et une expression moindre dans les feuilles sont 35 montrées dans la Fig. 9. Ces résultats indiquent que les régions à croissance active présentent une expression abondante du gène *OsPSK*.

Finalement, une analyse par transfert de Southern a été exécutée après traitement avec différentes enzymes de restriction. Les enzymes de restriction utilisées pour le traitement enzymatique de la Fig. 10 étaient Bam HI (Ba), Eco RI (Ec), Xba I (Xb) et Xho I (Xh). De multiples petites bandes ont été observées dans l'échantillon traité avec EcoR I, ce qui indique que le gène *OsPSK* peut appartenir à une famille de gènes multiples. Cependant, les multiples bandes qui s'hybrident issues de la digestion avec Eco RI ont pu être attribuées aux sites de restriction trouvés dans l'ADNc *OsPSK*. Pour le vérifier, le transfert a été testé de nouveau avec un fragment de 300 paires de bases provenant de l'extrémité 5' de l'ADNc *OsPSK*. Comme prévu, seule une bande (3,7 kilopaires de bases) s'est hybridée. Par conséquent, il apparaît que la préprophytosulfokine est codée par un seul gène et non pas par des gènes multiples.

Pour déterminer si des homologues d'*OsPSK* sont trouvés dans d'autres espèces végétales, une analyse par transfert de Southern a été exécutée après un traitement avec des enzymes de la restriction comme décrit dans la Fig. 10. Les enzymes utilisées pour le traitement de la Fig. 11 étaient Bam HI (Ba) et Eco RI (Ec), respectivement. Une analyse par transfert de Southern a été exécutée sur l'ADN génomique de quatre espèces dont on sait qu'elles produisent PSK, à savoir *Arabidopsis thaliana* (colonne 1), *Asparagus officinalis* (colonne 2), *Daucus carota* (colonne 3), et *Zinnia elegans* (colonne 4). Des homologues d'*OsPSK* ont été détectés dans les quatre espèces comme montré dans la Fig. 11, ce qui indique que le gène *OsPSK* est conservé dans les monocotylédones et les dicotylédones. Par conséquent, on suppose que l'incorporation du gène *OsPSK* est efficace dans différentes espèces de plantes.

25

Liste de séquences

<110> nom du demandeur: Président de l'université de Nagoya

<120> titre de l'invention: polypeptide précurseur de phytosulfokine, gène le codant, cellule végétale contenant ce gène et procédé pour stimuler la prolifération des cellules végétales

<160> nombre total de séquences: 2

<210> séquence n°. 1

<211> longueur de la séquence: 89 acides aminés

<212> type de séquence: acides aminés

35 <213> organisme : cellule Oc de *Oryza sativa* L.

<400> séquence:

MVNPGRTARA LCLLCLALLL LGQDTHSRKL LLQEKHSHGV GNGTTTQEP SRENGGSTGS 60
 5 NNNGQLQFDS AKWEEFHTDY IYTQDVKNP 89

- < 210> séquence n°. 2
- < 211> longueur de la séquence: 725 bases
- < 212> type de séquence: ADN
- 10 < 213> organisme : cellule Oc de *Oryza sativa* L.
- < 400> séquence:

	GAAGAAGCAG	CAGCAAAAAA	GTTGATCAGT	TAATTAGCAA	GTGTGTTCTT	CTTTCTTTTG	60
	GTGAGAGAGA	GAGAGAGAGA	GAGAGAGAGA	GAGATCTCAG	AATGGTGAAT	CCAGGAAGAA	120
15	CAGCTAGGGC	ACTCTGCCCTC	CTATGCCCTG	CTCTCCTCCT	GCTAGGTCAA	GATACCCATT	180
	CCAGGAAGCT	CCTGTTGCAG	GAGAAGCACA	GCCATGGCGT	CGGCAACGGC	ACAACCACCA	240
	CCCAGGAACC	AAGCAGAGAG	AATGGAGGAA	GTACAGGTTC	CAATAACAAT	GGGCAGCTGC	300
	AGTTTGATTC	AGCCAATGG	GAAGAATTCC	ACACGGATTA	TATCTACACC	CAAGATGTCA	360
	AAAACCCATA	ATGGCTGTTTC	ATTATGATT	TGAACTAGTA	CTAGTAGCTT	ATACCTTCTG	420
20	CGCGTCTTTT	GTTCGTTTGG	AGAGGGGATT	TTCTTGGGAT	TTACCATATG	AACTAATTAA	480
	ATTTAAATCCC	AGGCAAATCC	CACTCAGCCC	ATTTTGTGCA	GAAGTTGTCA	GTGTGCACTG	540
	TATAATTATT	TAGTCATACA	CAACTACTCC	TGGTAACTAC	TCCTATCTTC	GATGAATTTT	600
	CTGGTTTGC	CAGACGTGAC	AATAGTCCAG	TAGCATGCAG	TACCCCTCTCA	GAATCCCTGT	660
	AATTTTTAGC	AAAAAAAAAA	GGAAGAAAAG	AAAAGAAGCT	TCCCTACTAA	AAAAAAAAAA	720
25	AAAAAA						725

REVENDICATIONS

1. Polypeptide précurseur de phytosulfokine caractérisé en ce qu'il consiste (a) en un polypeptide ayant la séquence des acides aminés 1 à 89 dans la 5 séquence n°. 1 de la liste de séquences, ou (b) en un polypeptide ayant une séquence d'acides aminés qui a plus de 40% d'homologie avec la séquence dudit polypeptide (a), ledit polypeptide étant soumis à une maturation et sulfaté sur les résidus tyrosine de ladite phytosulfokine dans une cellule végétale pour que la phytosulfokine dont les résidus tyrosine sont sulfatés soit sécrétée et puisse 10 stimuler la prolifération de ladite cellule végétale.
2. Gène caractérisé en ce qu'il code le polypeptide précurseur selon la revendication 1.
3. Gène selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence de bases parmi la séquence des bases 1 à 725 dans la séquence n°. 2 de 15 la liste de séquences et une séquence de bases qui s'hybride avec la séquence de bases précédente dans des conditions stringentes.
4. Cellule végétale transgénique caractérisée en ce qu'elle comprend le gène selon l'une quelconque des revendications 2 et 3 incorporé dans la cellule pour stimuler la prolifération de ladite cellule.
- 20 5. Procédé pour stimuler la prolifération d'une cellule végétale caractérisé en ce qu'il comprend l'incorporation du gène selon l'une quelconque des revendications 2 et 3 dans ladite cellule végétale.
6. Procédé pour produire une cellule végétale transgénique caractérisé en ce qu'il comprend l'incorporation du gène selon l'une quelconque des 25 revendications 2 et 3 dans une cellule végétale pour stimuler la prolifération de ladite cellule végétale.

FIG. 1

GAAGAACGAGCAGCAAAAAGTTGATCAGTTAATTAGCAAGTGTGTTCTCTTCTTTG	60
G <u>TGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCTCAGAATGGTGAATCCAGGAACAA</u>	120
<u>M V N P G R T</u>	7
CAGCTAGGGCACTCTGCCCTCTATGCCTTGCTCTCCTCTGCTAGGTCAAGATAACCATT	180
<u>A R A L C L L C L A L L L G Q D T H S</u>	27
CCAGGAAGCTCCTGTTGCAGGAGAAGCACAGCCATGGCGTCGCAACGGCACACCACCA	240
R K L L L Q E K H S H G V G N G T T T T	47
CCCAGGAACCAAGCAGAGAGAATGGAGGAAGTACAGGTTCCAATAACAATGGGCAGCTGC	300
Q E P S R E N G G S T G S N N N N G Q L Q	67
AGTTTGATTCAAGCAAATGGGAAGAATTCCACACGGATTATCTACACCCAAAGATGTCA	360
F \textcircled{D} S A K W \textcircled{D} \textcircled{E} F H T \textcircled{D} Y I Y T Q \textcircled{D} V K	87
AAAACCCATAATGGCTGTTCATTTATGATTGAACTAGTACTAGTAGCTATACCTTCTG	420
N P *	89
CGCGTCTTGTTCGTTGGAGAGGGATTTCTGGGATTAGCATATGAACATTAA	480
ATTAATCCCAGGCAAATCCACTCAGCCATTGTGCAGAAGTTGTCAGTGTGCACTG	540
TATAATTATTAGTCATACACAACACTCCTGGTAACACTCCTATCTCGATGAATT	600
CTGGTTTGCAGACGTGACAATAGTCCAGTAGCATGCCAGTACCCCTCTCAGAATCCCTGT	660
AATTTTAGCAAAAAAAAAGGAAGAAAAGAAAAGCTTCCCTACT-Poly(A)	725

— — SEQUENCE DE GA REPETES

— — — SEQUENCE SIGNAL N-TERMINALE

— — — — SEQUENCE DE PSK- α 

SITE DE RECONNAISSANCE DE LA PROTEASE V8



ACIDE AMINE ACIDE

2/7

FIG. 2

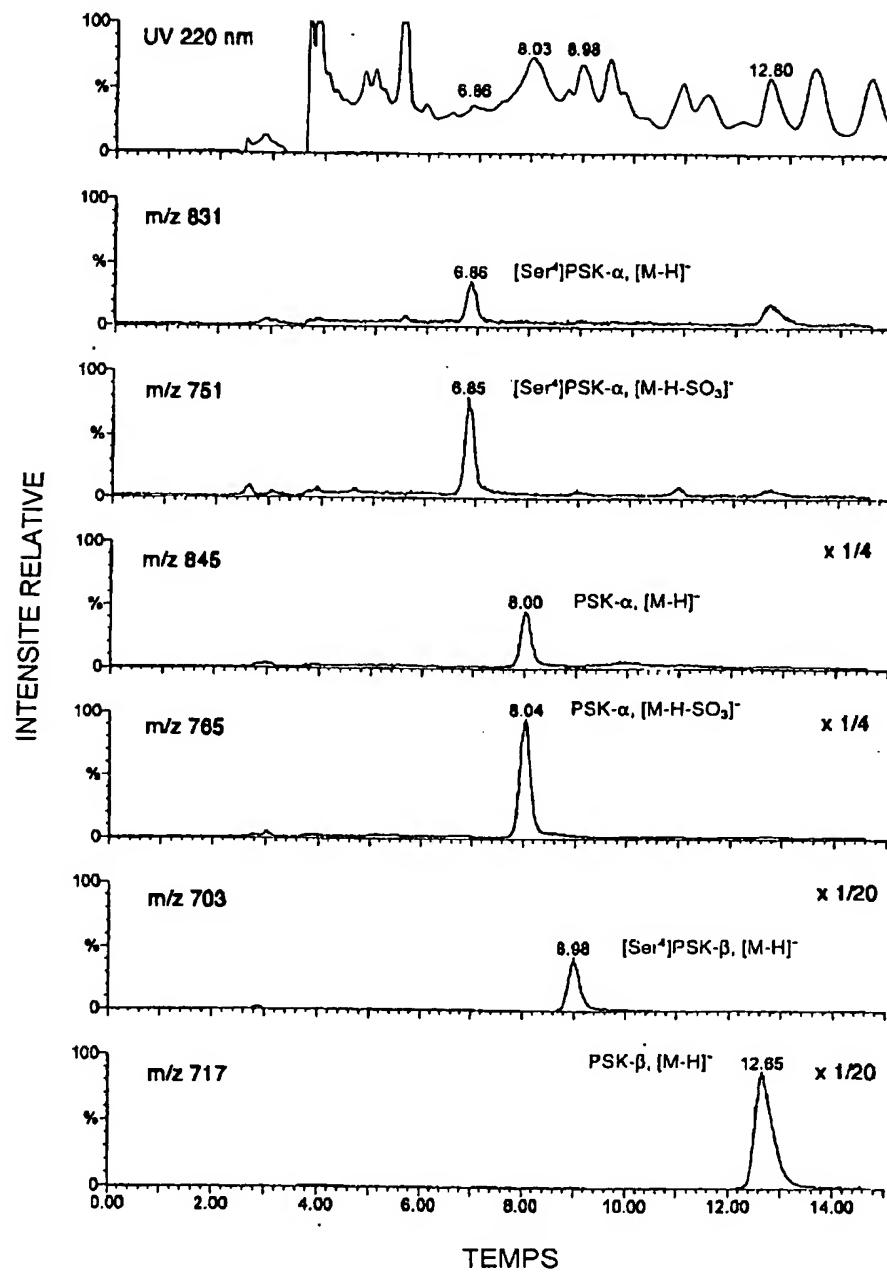
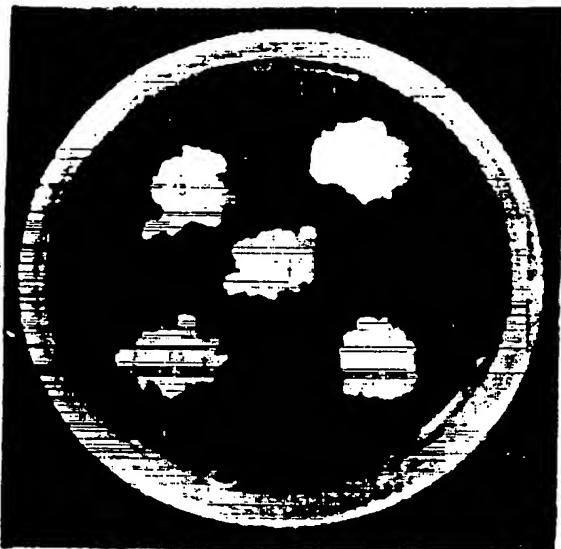
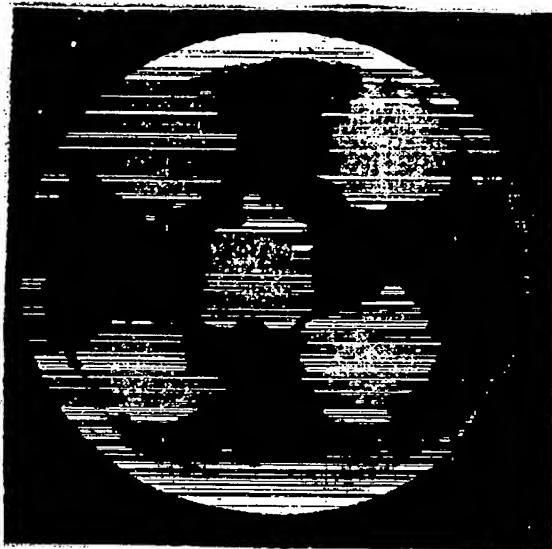
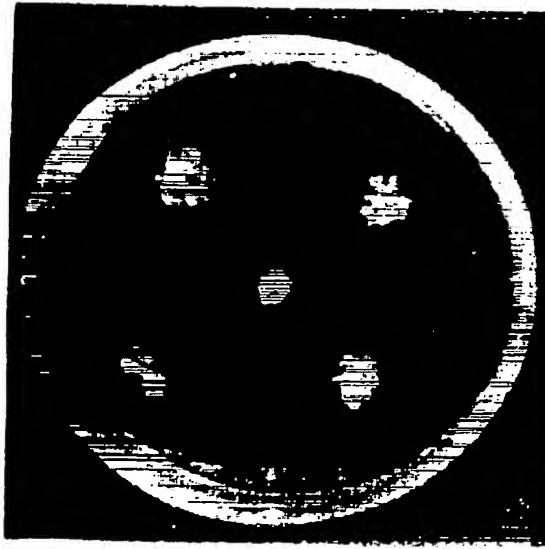


FIG. 3*FIG. 4**FIG. 5*

4/7

FIG. 6

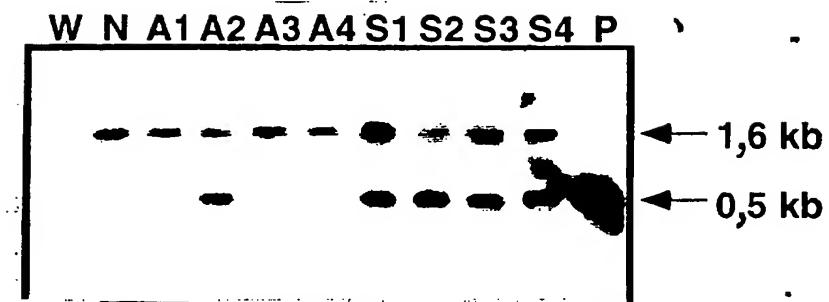


FIG. 7

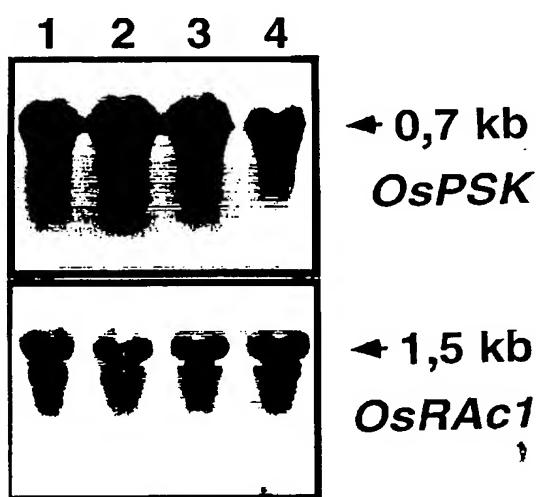


FIG. 8

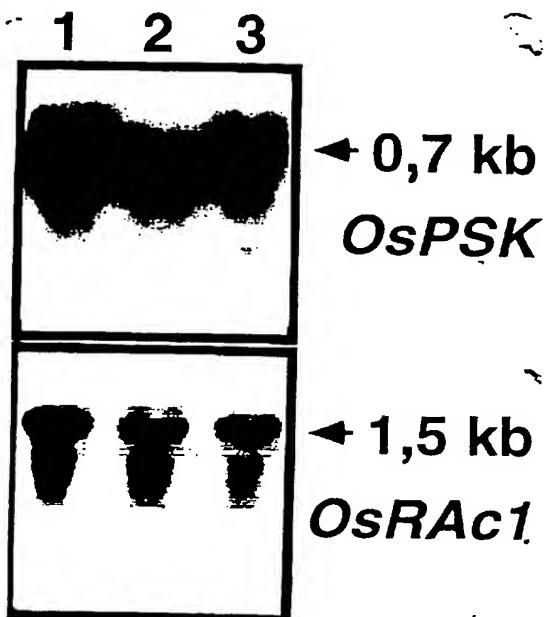
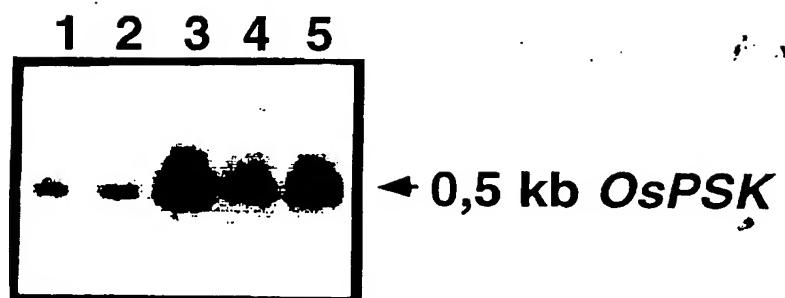


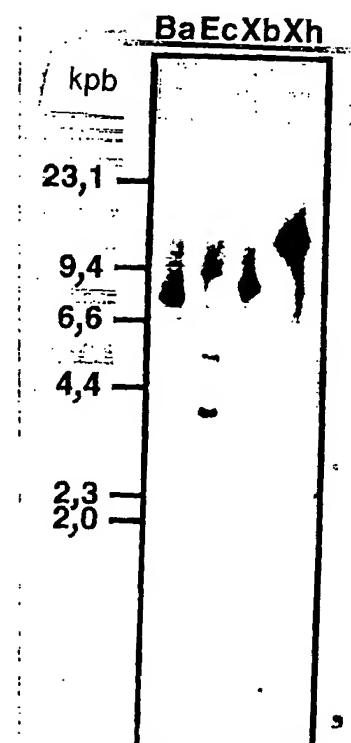
FIG. 9



2791347

6/7

FIG. 10



2791347

7/7

FIG. 11

